

- AN - 1996-280763 [29]
- AP - JP19940256494 19941021
- PR - JP19940256494 19941021
- TI - Base for cell cultivation of animal cells to obtain physiologically-active substances e.g. vaccine(s), hormone(s) etc. - consists of polymer having on side(s), thin film of silicon, aluminium magnesium and/or iron oxide(s)
- IW - BASE CELL CULTIVATE ANIMAL CELL OBTAIN PHYSIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCE VACCINE HORMONE CONSIST POLYMER SIDE THIN FILM SILICON ALUMINIUM MAGNESIUM IRON OXIDE
- PA - (TOXW ) TOYO INK MFG CO LTD
- PN - JP8116963 A 19960514 DW199629 C12M3/00 004pp
- IC - C12M3/00 ; C12N5/06 ; C12N11/14
- AB - J08116963 Base for cell cultivation is made of polymer. On one or both sides is a thin film layer of Si, Al, Mg and/or Fe oxides formed by means of a technique for vacuum thin film formation. Polymer is polyester resins (e.g. PET), polyamide resins (e.g. nylon), cellulose resins, polycarbonate resins, etc. Polymer may be formed into film, unwoven fabric, or spun bonded of which thickness is 5-500 (pref. 12-250)microns. Thin film layer may be formed with Si, SiO<sub>2</sub>, SiO, Si<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Si<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Al, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Mg, MgO, Fe, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, or Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> or with SiO<sub>2</sub>/2MgO (forsterite), 2SiO<sub>2</sub>/MgO, or 2SiO<sub>2</sub>/3Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (80-98 mole%/20-2mole%), of which the thickness is 50-2000 (pref. 200-1000)angstrom. Technique for thin film formation includes vacuum vapour deposition, ion plating, sputtering, plasma CVD, and microwave CVD.
- USE/ADVANTAGE - Base can be used as culture media in cultivation of animal cells in order to produce physiologically-active substances, e.g. vaccines, hormones, interferons. Cells are readily adhesive to the media to grow. Cell is grown can easily be recovered, are sterilisable with an autoclave, chemically or biologically stable, inexpensive and can be observed under a light microscope since their base is transparent.(Dwg.0/0)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-116963

(43)公開日 平成8年(1996)5月14日

|                             |      |         |               |        |
|-----------------------------|------|---------|---------------|--------|
| (51)Int.Cl. <sup>6</sup>    | 識別記号 | 庁内整理番号  | F I           | 技術表示箇所 |
| C 1 2 M 3/00                | Z    |         |               |        |
| C 1 2 N 5/06                |      |         |               |        |
| 11/14                       |      | 7729-4B | C 1 2 N 5/ 00 | E      |
| 審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 4 頁) |      |         |               |        |

(21)出願番号 特願平6-256494

(22)出願日 平成6年(1994)10月21日

(71)出願人 000222118

東洋インキ製造株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番13号

(72)発明者 町田 敏則

東京都中央区京橋二丁目3番13号東洋イン  
キ製造株式会社内

(72)発明者 尾崎 邦彦

東京都中央区京橋二丁目3番13号東洋イン  
キ製造株式会社内

(54)【発明の名称】 細胞培養用基材

(57)【要約】

【目的】培養効率が高く、安定な細胞培養が可能で、取扱いやすいことを特徴とする安価な細胞培養用基材の提供。

【構成】高分子基材の片面または両面に、真空薄膜形成技術によって、マグネシウム酸化物または鉄酸化物からなる薄膜層、あるいはけい素酸化物と、アルミニウム酸化物、マグネシウム酸化物および鉄酸化物から選ばれる一種または二種以上とからなる薄膜層を形成してなることを特徴とする細胞培養用基材。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】高分子基材の片面または両面に、真空薄膜形成技術によって、マグネシウム酸化物または鉄酸化物からなる薄膜層を形成してなることを特徴とする細胞培養用基材。

【請求項2】高分子基材の片面または両面に、真空薄膜形成技術によって、けい素酸化物と、アルミニウム酸化物、マグネシウム酸化物および鉄酸化物から選ばれる一種または二種以上とからなる薄膜層を形成してなることを特徴とする細胞培養用基材。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞培養用基材に関する。さらに詳細には、動物細胞を培養するために使用される細胞培養用基材に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、生物の細胞を培養し、薬物の有用性や有害性を動物実験前にスクリーニングしたり、その細胞の代謝活動により有用な生理活性物質、例えばワクチン、ホルモン、インターフェロン等を生産する研究が活発に行われている。生体中で働く生理活性物質のほとんどは糖質などを含んだ複合タンパクであり、これらの付加が活性発現または生体内での安定性に必要不可欠であるとの例も多く見つかっているため、天然型またはそれに近い物質を生産することのできる動物細胞の大量培養の必要性が増加している。

【0003】しかし、ほとんどの臓器細胞を生体外で培養した場合に、固体表面に付着・伸展した後に増殖するという、いわゆる接着依存性を示す。この接着依存性動物細胞は、固体表面への付着伸展が増殖の前提になり、また、表面に密に増殖した細胞は一般に増殖を停止するなどの性質があるため、大量培養技術について決定的なものが提示されるに至っていない。接着依存性動物細胞の培養には、ガラス、プラスチック製のシャーレなどを用いる方法や、マイクロキャリア法と呼ばれる疑似浮遊培養法が用いられている。それ以外には、フィルム状の培養用基材も市販されている。

【0004】従来より使用されていた石英ガラスを主体としたガラスシャーレは非常に高価で、落とした場合に割れやすく、各種細菌を扱う細胞培養の現場では人体を殺傷する危険性があるため、表面を様々な方法で親水化処理したプラスチックシャーレを利用する道が開けた。しかし、プラスチックシャーレは、培養過程あるいは培養後において培養状態の確認その他で写真を撮る場合、希望の大きさにカットできないため取扱い難いなどの不便さがあり、またこの方法だとある増殖数で限界となり培養効率が上がらない。一方、市販のフィルム状培養基材は、複雑な工程を経て製造される為、非常に高価であり、基本的に使い捨てを考えたい現場ではなかなか受け入れられない。また、マイクロキャリア法では、浮遊中

2

に培養された細胞が担体にあたって壊れる、細胞を取り出し難いなどの難点がある。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、培養効率が高く、安定な細胞培養が可能で、取扱いやすいことを特徴とする安価な細胞培養用基材を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の目的は、高分子基材の片面または両面に、真空薄膜形成技術によって、マグネシウム酸化物または鉄酸化物からなる薄膜層を形成してなることを特徴とする細胞培養用基材によって達成できる。本発明の目的はさらに、高分子基材の片面または両面に、真空薄膜形成技術によって、けい素酸化物と、アルミニウム酸化物、マグネシウム酸化物および鉄酸化物から選ばれる一種または二種以上とからなる薄膜層を形成してなることを特徴とする細胞培養用基材によって達成できる。

【0007】本発明の細胞培養用基材は、とりわけ付着依存性細胞を効率的に培養し、薬物の有用性や有害性を動物実験前にスクリーニングしたり、該細胞が分泌する生理活性蛋白質を効率的に増殖あるいは回収することができるものである。そのために、下記の条件を全て具備している。

- (1) 細胞が付着し、増殖しやすいこと
- (2) 増殖した細胞が簡単に取り出せること
- (3) オートクレーブ殺菌が可能であること
- (4) 化学的、生物学的に安定な基材であること
- (5) 廉価な細胞培養基材であること
- (6) 透過式光学系顕微鏡で状態が観察出来る透明性を有していること

【0008】高分子基材としては、機械的強度を有するものであればいかなるものでも使用でき、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリエチレン-2, 6-ナフタレートなどのポリエステル樹脂、ナイロン等のポリアミド樹脂、ポリイミド樹脂、ポリスルホン樹脂、セルロース系樹脂、シリコーン樹脂、ポリウレタン樹脂、ポリ酢酸ビニル樹脂、ポリビニルアセタール樹脂、ポリアクリロニトリル樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂、ポリ塩化ビニリデン樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリフィニレンオキサイド樹脂、ポリビニルアルコール樹脂、ポリメチルメタクリレート等のアクリル系樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリエチレン樹脂、ポリプロピレン樹脂等のポリオレフィン樹脂、ポリエーテルサルフォン樹脂、ポリエーテルエーテルケトン樹脂、ポリフェノキシエーテル樹脂、ポリアリレート樹脂、フッ素樹脂、エチレン・ビニルアルコール共重合体/エチレン・酢酸ビニル共重合体けん化物(EVOH)等が適用できる。

【0009】この中でも、特にポリエチレンテレフタレ

ートが望ましい。高分子基材の形態は、通常のフィルムだけでなく、不織布、スパンボンドなどでもよい。また、培養効率を上げるためには表面積を増加させる必要があり、凸凹状や皺状に加工したフィルムや穴のあいた多孔性フィルムを用いても良い。高分子基材の厚さは特に制限されないが、 $5 \sim 500 \mu$ 、特に $12 \sim 250 \mu$ が適当である。

【0010】薄膜層は、マグネシウム酸化物または鉄酸化物、あるいはけい素酸化物と、アルミニウム酸化物、マグネシウム酸化物および鉄酸化物から選ばれる一種または二種以上とからなり、高分子基材に対して強固に密着していなければならない。薄膜層の組成比は、物性に悪影響を及ぼさない範囲なら問題ないが、けい素酸化物：アルミニウム酸化物、マグネシウム酸化物および鉄酸化物から選ばれる一種または二種以上＝ $80 \sim 98$ モル%： $20 \sim 2$ モル%の範囲内が望ましい。薄膜層を形成するけい素酸化物は、 $SiO_x$ で表現される化合物であり、酸化度(xの値)が1.2以上、さらには1.7以上であることが望ましい。

【0011】薄膜層を形成する原料のうち、けい素酸化物としては、 $Si$ 、 $SiO_2$ 、 $SiO$ 、 $Si_2O_3$ 、 $Si_3O_4$ から選ばれる一種または二種以上が使用できる。アルミニウム酸化物としては $Al$ 、 $Al_2O_3$ 、マグネシウム酸化物としては $Mg$ 、 $MgO$ 、鉄酸化物としては $Fe$ 、 $Fe_2O_3$ 、 $Fe_3O_4$ が使用できる。この他に、けい素酸化物とマグネシウム酸化物の共酸化物であるフォーステライト( $SiO_2 \cdot 2MgO$ )やステアタイト( $2SiO_2 \cdot MgO$ )や、けい素酸化物とアルミニウム酸化物の共酸化物であるムライト( $2SiO_2 \cdot 3Al_2O_3$ )も使用できる。

【0012】高分子基材に薄膜層を形成する真空薄膜形成技術の方式は、巻き取り連続方式、枚葉方式のどちらでもよく、形成する方法としては、真空蒸着、イオンプレーティング、スパッタリング、プラズマCVD、マイクロウェーブCVDなどを用いることができる。さらに、真空蒸着の加熱方法は、蒸着中にスブラッシュと呼ばれる蒸着飛沫が発生しなければ、あるいは支障なく取り除ける程度に少なければ特に制限はなく、高周波誘導加熱、抵抗加熱、電子線加熱などの公知の加熱方法を用いることができる。蒸着飛沫が多量に発生すると、飛沫が蒸着フィルム上に異物として残り、残った異物は細胞培養上の障害になる可能性がある。

【0013】真空蒸着の蒸発源としては一般的なルツボ方式も適用できるが、異なる昇華点、融点の物質が常時均一に真空蒸着できる特開平1-252768に示される蒸発原料を連続的に供給排出する方式も適用できる。また、上記以外の薄膜層の形成方法としては、金属または有機金属化合物のような金属を含む化合物を酸化させながら真空蒸着する方法、後工程で蒸着層を酸化処理する方法があげられる。酸化処理の方法としては、高分子

基材の使用可能温度範囲内で処理を行う方法なら特に限定されず、蒸着中の酸素ガス導入法、放電処理法、酸素プラズマ法、熱酸化法等が挙げられる。

【0014】薄膜層の厚さは使用する高分子基材に合わせて選定されるが、片面あたり $50 \sim 2000$ オングストローム、特に $200 \sim 1000$ オングストロームが望ましい。また、薄膜層は、最終的に得られる層の必要機能が得られていれば、二重積層や多重積層構造でも構わない。すなわち、積層を2回以上に分けて行ってもよく、その時、異種類の金属酸化物を積層しても構わない。

【0015】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。評価方法は、以下に示すとおりである。

オートクレーブ殺菌耐性：オートクレーブにかけ( $121^\circ C$ 、15分)、殺菌後の細胞培養基材を目視にて観察した。

細胞培養状態：培地として市販の無血清培地を使用し、 $100 \times 10^3$ セル/2mlのHAIL-55細胞(ヒト正常2倍体繊維芽細胞)をサスペンションした。5日間の培養( $5\% CO_2$ 、 $37^\circ C$ )後に、透過式光学顕微鏡40倍で写真撮影し、セル数をカウントした。

細胞培養効率： $0.25\%$ トリプシンでシングルセルとし、細胞数をカウントした。現在使用されている培養用シャーレの場合、セル数 $450 \sim 470 \times 10^3$ でコンタクトインヒビションが働き、増殖が止まって細胞が死に出す。

【0016】【実施例1】特開平1-252768に記載された蒸発原料を連続的に供給排出する方式の連続巻き取り式抵抗加熱方式の真空蒸着機を用い、厚さ $100 \mu$ の二軸延伸ポリエチレンテレフタレートフィルムの片面に、一酸化けい素およびけい素酸化物とマグネシウム酸化物の共酸化物(フォーステライト： $SiO_2 \cdot 2MgO$ )の混合物(混合比 $90$ モル%： $10$ モル%)を加熱真空蒸着した(薄膜層の厚みは約 $600$ オングストローム)。

【0017】【実施例2】実施例1で使用した蒸着装置の蒸発源を抵抗加熱方式から電子線加熱方式に変更し、厚さ $100 \mu$ の二軸延伸ポリエチレンテレフタレートフィルムの片面に、酸化第一鉄を加熱真空蒸着した(薄膜層の厚みは約 $600$ オングストローム)。

【0018】【実施例3】実施例2と同様の蒸着装置を用い、厚さ $100 \mu$ のポリカーボネートフィルムの片面に、酸化マグネシウムを加熱真空蒸着した(薄膜層の厚みは約 $600$ オングストローム)。

【0019】【実施例4】実施例2と同様の蒸着装置を用い、厚さ $100 \mu$ の二軸延伸ポリエチレンテレフタレートフィルムの片面に、一酸化けい素と酸化第一鉄の混

5

合物（混合比90モル%：10モル%）を加熱真空蒸着した（薄膜層の厚みは約600オングストローム）。

【0020】〔実施例5〕実施例2と同様の蒸着装置を用い、厚さ100 $\mu$ の二軸延伸ポリエチレンテレフタレートフィルムの片面に、一酸化けい素と酸化アルミニウムの混合物（混合比80モル%：20モル%）を加熱真空蒸着した（薄膜層の厚みは約600オングストローム）。

【0021】〔比較例1〕実施例1と同様の蒸着装置を用い、厚さ100 $\mu$ の二軸延伸ポリエチレンテレフタレートフィルムの片面に、一酸化けい素を加熱真空蒸着し\*

6

\*た（薄膜層の厚みは約600オングストローム）。

【0022】実施例1～5および比較例1で得られた細胞培養用基材を直径3cmの親水処理したプラスチックシャーレに合うように円状に切断し、プラスチックシャーレ内にセットし、オートクレーブ殺菌耐性、細胞培養状態および細胞培養効率を評価した。また、比較のため、親水処理された市販の細胞培養用プラスチックシャーレを用いて同様の評価を行った（比較例2）。結果を表1に示す。

【0023】

【表1】

|      | オートクレーブ<br>殺菌耐性 | 細胞培養状態<br>(顕微鏡観察)         | 細胞培養効率<br>(セル数)   |
|------|-----------------|---------------------------|-------------------|
| 実施例1 | 問題なし            | 増殖密度が高い                   | $600 \times 10^3$ |
| 実施例2 | 問題なし            | 増殖密度が高い                   | $630 \times 10^3$ |
| 実施例3 | 問題なし            | 増殖密度が高い                   | $620 \times 10^3$ |
| 実施例4 | 問題なし            | 増殖密度が高い                   | $610 \times 10^3$ |
| 実施例5 | 問題なし            | 増殖密度が高い                   | $600 \times 10^3$ |
| 比較例1 | 問題なし            | 増殖密度が低い<br>細胞が死に始め<br>ている | $430 \times 10^3$ |
| 比較例2 | 問題なし            | 増殖密度が低い<br>(観察しにくい)       | $424 \times 10^3$ |

【0024】

【発明の効果】本発明の細胞培養用基材は、細胞を効率的に培養でき、しかもオートクレーブ殺菌が可能で、か

つ取扱い易く、細胞培養用基材として極めて有用である。